

A4

ANAEROBIC PETROLEUM-DEGRADING BACTERIUM

Patent number: JP2001128678
Publication date: 2001-05-15
Inventor: WATANABE KAZUYA; KODAMA YUMIKO; HARAYAMA SHIGEAKI
Applicant: MARINE BIOTECH INST CO LTD
Classification:
- international: C12N1/20; C12N15/09; C12N1/20; C12N15/09; (IPC1-7): C12N15/09; C12N1/20
- european:
Application number: JP19990312451 19991102
Priority number(s): JP19990312451 19991102

Report a data error here

Abstract of JP2001128678

PROBLEM TO BE SOLVED: To allow efficiently degrading/removing a petroleum compound which pollutes an anaerobic environment such as underground water. **SOLUTION:** A bacterium is obtained which can grow by assimilating a petroleum compound under an anaerobic condition, and a method is provided which allows efficiently detecting the bacterium.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-128678
(P2001-128678A)

(43) 公開日 平成13年5月15日 (2001. 5. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
C 1 2 N 15/09 1/20	Z N A	C 1 2 N 1/20	A 4 B 0 2 4 D 4 B 0 6 3 F 4 B 0 6 6
C 1 2 Q 1/04		C 1 2 Q 1/04 1/68	A
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平11-312451	(71) 出願人	591001949 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所 東京都文京区本郷1丁目28番10号
(22) 出願日	平成11年11月2日 (1999. 11. 2)	(72) 発明者	渡辺 一哉 岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会 社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究 所内
		(72) 発明者	兒玉 裕美子 岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会 社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究 所内
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外2名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 嫌気石油分解菌

(57) 【要約】

【解決手段】 嫌気条件下で石油化合物を資化し、増殖することができる新規な細菌、及びその細菌を特異的に検出する方法。

【効果】 地下水などの嫌気的環境を汚染した石油化合物を効率的に分解除去できるようになる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(1)～(2)の性質を有するεプロテオバクテリアに属する細菌。

(1) 16S rRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号2記載の塩基配列と90%以上の相同性を示す。

(2) 嫌気条件下で石油化合物を資化し、増殖することができる。

【請求項2】 配列番号3記載の塩基配列により表されるDNA、又は配列番号3記載の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列により表され、かつ配列番号2記載の塩基配列により表されるDNAとハイブリダイズすることのできるDNA。

【請求項3】 請求項2記載のDNAを用いて請求項1記載の細菌を特異的に検出する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、嫌気条件下で石油化合物を分解できるεプロテオバクテリアに属する新属の細菌に関する。この細菌を利用することにより、地下水などの嫌気的環境を汚染した石油化合物を効率的に分解除去できる。

【0002】

【従来の技術】石油化合物は、しばしば環境汚染を引き起こす。このために石油汚染環境を修復するための技術開発がなされてきた。このうち微生物の分解能力を利用するバイオレメディエーションは、地表の好気的環境において適用の可能性が示唆されている。しかし、嫌気的環境における石油化合物の分解速度が非常に遅いため、石油汚染地下水のバイオレメディエーションは非常に難しい。地下水を汲み上げるか、空気を注入すれば分解が促進されるが、これにはコストがかかる。

【0003】一方、嫌気的に石油化合物を分解する細菌は、今までに幾つか単離されている(Heider, J., A. M. Spormann, H. R. Beller, and F. Widdel. 1999. An aerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. FEMS Microbiol. Rev. 22:459-473.)。それらは、βプロテオバクテリアまたはδプロテオバクテリアに属する。しかし、それらが実際の汚染環境中でも石油化合物の分解をになっているという証拠はほとんどない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】石油汚染地下水中で優占的なポピュレーションを形成することができる嫌気的石油分解菌を獲得し、その性質を把握できれば、汚染現場地下水中にいるその細菌を選択的に利用し石油分解を促進させることができる。また、微生物製剤化しておけば、汚染地下水に投入し速やかに石油汚染を修復できる。さらに、バイオレメディエーションの効果と危険性評価のために、用いた細菌の消長をモニタリングすることが必要となる。本発明の目的は、嫌気条件下で石油化合物を資化し、増殖することができる新規な微生物、及

びその検出手段を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、εプロテオバクテリアに属する新属の細菌が石油汚染地下水中で優占化していることを見出し、さらにこの細菌を単離することに成功した。さらに、この細菌に特異的な塩基配列を16S rRNA遺伝子のなかに見つけ、特異的検出に成功した。本発明は、以上のような知見に基づき完成されたものである。

【0006】即ち、本発明は、以下の(1)～(2)の性質を有するεプロテオバクテリアに属する細菌である。

(1) 16S rRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号2記載の塩基配列と90%以上の相同性を示す。

(2) 嫌気条件下で石油化合物を資化し、増殖することができる。

【0007】また、本発明は、配列番号3記載の塩基配列により表されるDNA、又は配列番号3記載の塩基配列において1もしくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列により表され、かつ配列番号2記載の塩基配列により表されるDNAとハイブリダイズすることのできるDNAである。更に、本発明は、上記のDNAを用いて上記の細菌を特異的に検出する方法である。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

〔1〕εプロテオバクテリアに属する新規な細菌

本発明のεプロテオバクテリアに属する細菌は、以下の(1)～(2)の性質を有するものである。

(1) 16S rRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号2記載の塩基配列と90%以上の相同性を示す。

(2) 嫌気条件下で石油化合物を資化し、増殖することができる。

【0009】本発明の細菌の16S rRNA遺伝子の塩基配列は、上述のように配列番号2記載の塩基配列と90%以上の相同性を示すが、92%以上の相同性を示すことが好ましく、95%以上の相同性を示すことが更に好ましい。本発明の細菌の一例としては、YK-1株を挙げることができる。この菌株は工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-17620として寄託されている(寄託日：平成11年10月26日)。

【0010】〔2〕εプロテオバクテリアに属する新規な細菌の検出法

本発明のεプロテオバクテリアに属する細菌の16S rRNA遺伝子中には、配列番号3記載の塩基配列と相補的な塩基配列が含まれている。この配列は、図4に記載されている細菌の16S rRNA遺伝子中には含まれない。従って、この配列を利用して本発明の細菌の特異的な検出を行うことが可能である。また、配列番号3記載の塩基配列において1若しくは複数個の塩基が置換、欠失、付加され

た塩基配列により表されるDNAも、配列番号2で表されるDNAとハイブリダイズすることができる限り、本発明の細菌の検出に利用することができる。

【0011】本発明の細菌を検出する方法としては、ハイブリダイゼーション法やポリメラーゼ連鎖反応（以下PCRという）など一般的な方法が適用できる。さらに、fluorescence in situ hybridization（以下FISHという）（Wagner, M., R. Amann, H. Lemme, and K. Schleife. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotide specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1520-1525.）や定量的PCR（Diviacco, S., P. Norio, L. Zentilin, S. Menzo, M. Clementi, G. Biamonti, S. Riva, A. Falaschi, and M. Giacca. 1992. A novel procedure for quantitative polymerase chain reaction by coamplification of competitive templates. *Nuc. Acids Res.* 122:313-320.、または Watanabe, K., S. Yamamoto, S. Hino, and S. Harayama. 1998. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by gyrB-targeted quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1203-1209.）を適用することにより、菌の検出だけでなく、菌数を計測できる。

【0012】

【実施例】〔実施例1〕石油汚染地下水中の優占的細菌の検出

岩手県久慈市の日本地下石油備蓄（株）において、岩盤

タンクから排出されてくる地下水（湧水）、その周辺の地下水、及び水封水をサンプリングした。湧水は、溶存全有機炭素濃度として約50 ppmの石油炭化水素で汚染されていた。これらの水サンプル2 Lから微生物を0.22 μm ポアサイズの膜を用いた濾過により集め、渡辺らの方法（Watanabe, K., S. Yamamoto, S. Hino, and S. Harayama. 1998. Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by gyrB-targeted quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1203-1209.）によりDNAを抽出した。Muyzerらが記したPCRにより（Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.）、抽出DNAから16Sリボソーム遺伝子のV3領域断片を増幅し、これを変性剤勾配電気泳動（以下、「DGGE」という）（Muyzer, G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.）にかけ断片の解析を行った。図1に結果を示す。各レーンのサンプルは表1に示すとおりである。

【0013】

【表1】

レーン	サンプル
1	地下石油備蓄タンク TK101 から排出された石油汚染地下水（サンプリング 1998 年 5 月）
2	地下石油備蓄タンク TK101 から排出された石油汚染地下水（サンプリング 1998 年 7 月）
3	地下石油備蓄タンク TK101 から排出された石油汚染地下水（サンプリング 1998 年 11 月）
4	地下石油備蓄タンク TK101 から排出された石油汚染地下水（サンプリング 1999 年 3 月）
5	地下石油備蓄タンク TK102 から排出された石油汚染地下水（サンプリング 1998 年 7 月）
6	地下石油備蓄タンク TK103 から排出された石油汚染地下水（サンプリング 1998 年 7 月）
7	地下石油備蓄基地水封水（サンプリング 1998 年 7 月）
8	地下石油備蓄基地周辺（発生地区）の非汚染地下水（サンプリング 1998 年 7 月）
9	地下石油備蓄基地周辺（半崎地区）の非汚染地下水（サンプリング 1998 年 7 月）
10	地下石油備蓄基地周辺（半崎地区）の非汚染地下水（サンプリング 1998 年 7 月）

【0014】図1に示すように、石油汚染地下水をサンプルとしたレーンでは、バンドeが特異的に検出された。このバンドeは、石油汚染地下水中で優先的に増殖した細菌由来のDNA断片であると推察された。

【0015】図1中のバンドa～hをゲルから抽出し（Watanabe, K., M. Teramoto, H. Futamata, and S. Harayama. 1998. Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4396-4402.）、それらの塩基配列を決定した。各バンド由来の生物と近縁関係にあると推定される生物等を表2に示す。また、バンドeの塩基配列を配列番号1に示す。

ant phenol-degrading bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4396-4402.）、それらの塩基配列を決定した。各バンド由来の生物と近縁関係にあると推定される生物等を表2に示す。また、バンドeの塩基配列を配列番号1に示す。

【0016】

【表2】

DGGE で検出された主要バンドの塩基配列の解析

バンド	長さ (bp)	近縁関係にある生物	相同性 (%)
a	189	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	93%
b	169	<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	100%
c	173	<i>Meiothermus ruber</i>	83%
d	194	<i>Pseudomonas putida</i>	100%
e	169	<i>Thiomicrospira denitrificans</i>	97%
f	194	<i>Aquaspirillum delicatum</i>	96%
g	194	<i>Burkholderia phenazinium</i>	95%
h	169	Actinomycete Lg2	92%

【0017】表1に示すように、バンドeはThiomicrospira denitrificans由来のDNA断片と相同性が高かった。

【0018】〔実施例2〕汚染炭化水素分解試験
30 mlのボトルに、9 mlの地下石油汚染タンクから排出された石油汚染地下水と無機栄養塩として1 mlの培地113 (DSMカタログ) を入れ、ブチルラバー蓋で窒素封入条件下で密栓をした後20°Cに静置した。

【0019】このボトルから気相0.2 mlをシリンジでサンプリングし、二又等の方法 (Futamata, H., K. Watanabe, and S. Harayama. 1998. Relationships between the trichloroethylene-degrading activities and the amino acid sequences of phenol hydroxylases in phenol-degrading bacteria. p. 99-104. In The First International Conference on Remediation of Chlorinated and Recalcitrant Compounds. Battelle Press, Columbus, Ohio.) のガスクロマトグラフィーにより揮発性炭化水素の分析を行った。この結果を図2に示すように、気相中からトルエンなどの幾つかの炭化水素が消失していた。

【0020】また、静置後の石油汚染地下水中の菌数をDAPI法 (Watanabe, K., M. Teramoto, and S. Harayama. 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. Appl. Environ. Microbiol. 65:2813-2819.) により測定した。対照として、実験開始時の菌数及び無機栄養塩を添加しない場合の菌数も併せて測定した。この結果を表3に示す。

【0021】
【表3】

条件	菌数 (DAPI カウント)
実験開始時	6.2×10^6 cells/ml
無機栄養塩非添加	9.7×10^6 cells/ml
無機栄養塩添加	5.8×10^7 cells/ml

【0022】表3に示すように、無機栄養塩を添加することにより、石油汚染地下水中の微生物の増殖がみられた。さらに、静置後の石油汚染地下水中の菌相をDGGE法により調べた (図3レーン3)。対照として、実験開始時の菌相 (図3レーン1)、好氣的条件での菌相 (図3レーン2)、嫌氣的条件で無機栄養塩を添加しない場合の菌相 (図3レーン4) も併せて測定した。この結果を図3に示す。図3に示すように、嫌氣的条件で培養した場合はバンドeの微生物が増殖し、好氣的条件で培養した場合はバンドbの微生物が増殖した。なお、図3中、バンドe及びバンドbは、図1及び表2中のバンドe及びバンドbと同一のものである。以上の結果から、バンドeの微生物は、嫌氣的条件下でトルエンなどの炭化

水素を資化し、増殖するものと推測される。

【0023】〔実施例3〕バンドeによって示された細菌の単離

タンクTK101から得た石油汚染地下水を培地113 (DSMカタログ) 寒天プレートに塗布し、20°Cで一週間培養を行った。そこに現れたコロニーを拾い、新しい培地113寒天プレートに塗布し純化を行った。得られた単離株の16S rRNA遺伝子の配列を、渡辺らの方法 (Watanabe, K., Teramoto, M., and Harayama, S. 1999. An outbreak of nonflocculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. Appl. Environ. Microbiol. 65:2813-2819.) により決定した。その結果、バンドeと同じ配列をもつ

細菌が単離され、YK-1株と名付けた。この細菌の16S rRNA遺伝子の配列を、配列番号2に示す。この配列をもとに分子系統解析を行った結果(図4)、この株は新属の細菌であることが示唆された。

【0024】〔実施例4〕YK-1近似菌株の特異的検出
図4に記載された全ての細菌の配列を比較し、配列番号3に表されるYK-1株に特異的な配列を見出した。この配列で表されるDNAに蛍光色素TAMRAをつけたDNAプローブを合成し、fluorescence in situ hybridization (FISH) 法 (Wagner, M., R. Amann, H. Lemme, and K. Schleife. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotide specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. Appl. Environ. Microbiol. 59:

1520-1525.) により、YK-1近似株の特異的検出を行った。プローブを蛍光させた場合の画像を図5aに、DAPI染色により全菌を染色した場合の画像を図5bに示す。図5aからYK-1近似株の菌数を測定することができる。図5aと図5bの比較から、YK-1近似株はTK101湧水で全細菌の10%から30%の比率で存在することが判明した。

【0025】

【発明の効果】本発明は、嫌気条件下で石油化合物を分解できる新規な細菌を提供する。この細菌を利用することにより、地下水などの嫌気的環境を汚染した石油化合物を効率的に分解除去できるようになる。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

```
<110> MARINE BIOTECHNOLOGY INSTITUTE CO., LTD.
<120> KENKI SEKIYU BUNKAIKIN
<130> P99-0564
<160> 3
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 169
<212> DNA
<213> Unknown
<400> 1
cctacgggag gcagcagtga ggaatattgc acaatggagg aaactctgat gcagcaacgc 60
cgctggagg atgacgcatt tcggtgtgta aactcctttt aagagggaag ataagacgg 120
tacctcttga ataagcaccg gctaactccg tgccagcagc cgcgtaat 169
<210> 2
<211> 1438
<212> DNA
<213> Unknown
<400> 2
tggcgcgtg cctaacacat gcaagtcgaa cgatgatagg aagcttgctt ccttgattag 60
tggcgcacgg gtgagtatac catagataat gtacctctta gttcgggata gccactggaa 120
acggtgatta ataccgata ctctctcttg tcttaaggcg agtcgggaaa gttttttcgc 180
taagagatca gtctatgtcc tatcagctag ttggtgaggt aatggctcac caaggctatg 240
acgggtatct ggtttgagag gatgatcaga cacactggaa ctgagacacg gtccagactc 300
ctacgggagg cagcagttag gaattattgca caatggagga aactctgatg cagcaacgcc 360
gcgtggagga tgacgcattt cggtgtgtaa actcctttta agagggaaga taatgacggt 420
acctcttgaa taagcaccgg ctaactccgt gccagcagcc gcggtaatc ggagggtgca 480
agcgttactc ggaatcactg ggcgtaaagg gtgcgttagc tggtctctaa gtcagatgtg 540
aaatccaatg gcttaacatg tgaactgcat ttgaaactgg gagcctagag ttcagaaggg 600
gcagatggaa ttagtggtgt aggggtaaaa tccgtagata tcaactaggaa tatcaaaagc 660
gaagcgatc tgctgggatg atactgacgc tgaggcacga aagcgtgggg agcaaacagg 720
attagatacc ctggtagtcc acgccctaaa cgatgaatgc tagtcgtcgg ggagctcgtc 780
tcttcggtga tgcacttaac agattaagca ttccgcctgg ggagtacggt cgcaagatta 840
aaactcaaag gaatagacgg ggacccgcac aagtgttgga gcatgtggtt taattcgaag 900
atacagaag aaccttacct ggccctgaca tggtaggaac ccttaagaga ttagggggtg 960
ctagcttgct agaactaca cacaggtgct gcacggctgt cgtcagctcg tgcgtgaga 1020
```

```

tgttgggta agtcccgcaa cgagcgcaac cctcgtcttt agttgctaac agtttgctg 1080
agcactctaa agagactgcc ttcgtaagga ggaggaaggt gaggacgacg tcaagtcac 1140
atggccctta cggccagggc tacacacgtg ctacaatggg gcgtacaaag agctgcaata 1200
ccgcgaggtg gagccaatct cttaaagcgt ctctcagttc ggattgttct ctgcaactcg 1260
agaacatgaa gctggaatca ctagtaatcg tagatcagct atgctacggt gaatacgttc 1320
ccgggtcttg tactcaccgc ccgtcacacc atgggagttg atttaccgc aaatcgggat 1380
gccaaactgg ctaccgctta cggtggaatt agcgactggg gtgaagtcgt aacaaggt 1438

```

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Unknown

<400> 3

cagtatcatc ccagcaga

18

【図面の簡単な説明】

【図1】石油汚染地下水等をサンプルとしたDGGEの結果を示す写真である。

【図2】石油汚染地下水を封入したボトルの気相をサンプルとしたガスクロマトグラムを示す。

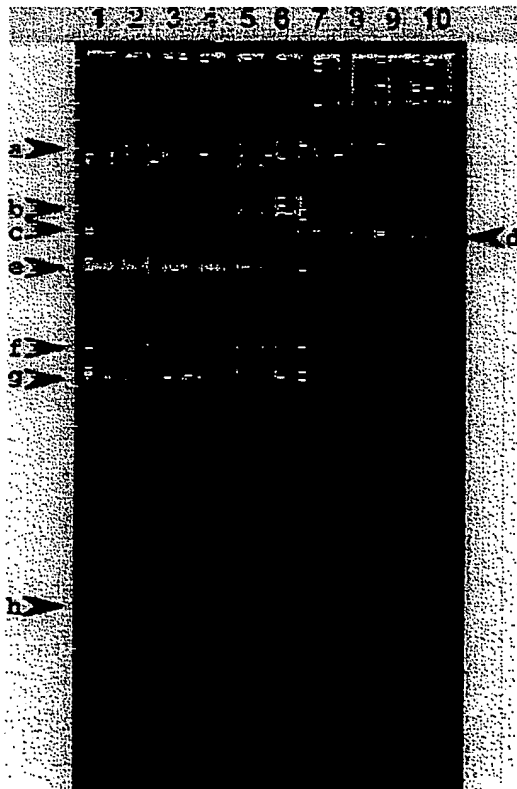
【図3】嫌氣的条件で一定時間静置した後の石油汚染地

下水をサンプルとしたDGGEの結果を示す写真である。

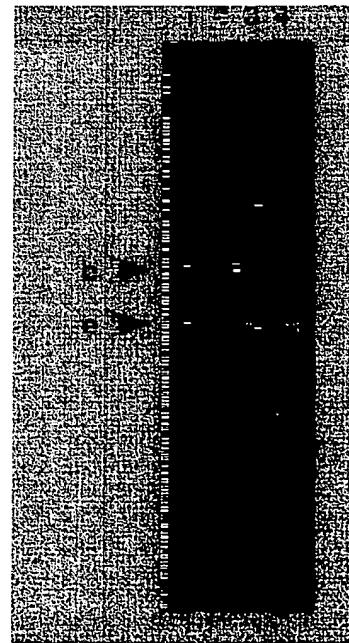
【図4】16S rRNA遺伝子を用いた系統樹を表す図である。

【図5】YK-1株に特異的なプローブを用いた蛍光in situ ハイブリダイゼーションの結果を示す写真である。

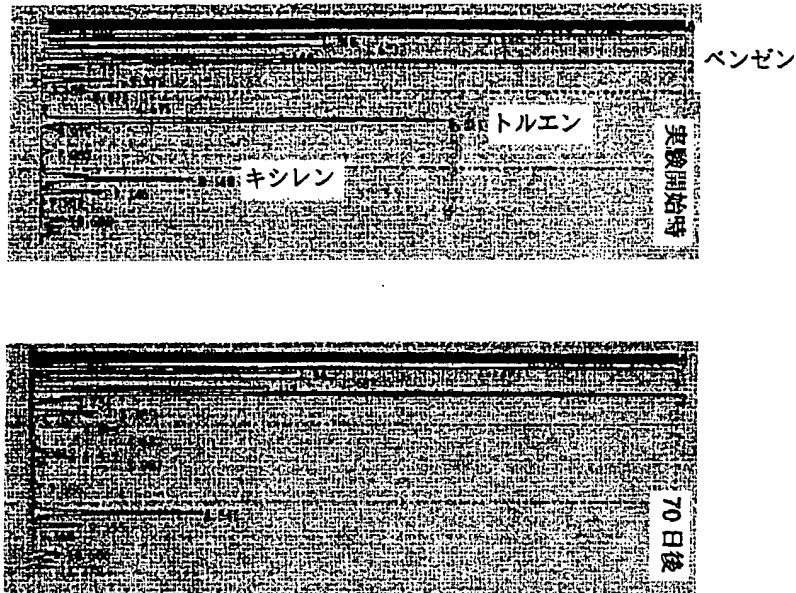
【図1】



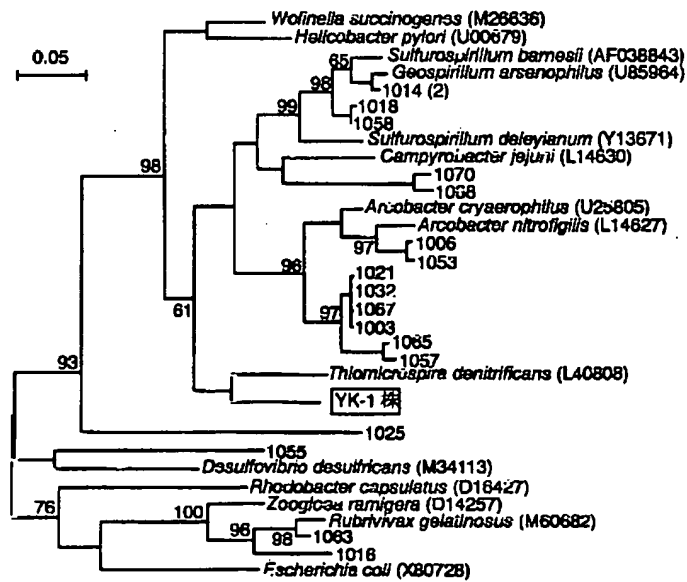
【図3】



【図2】



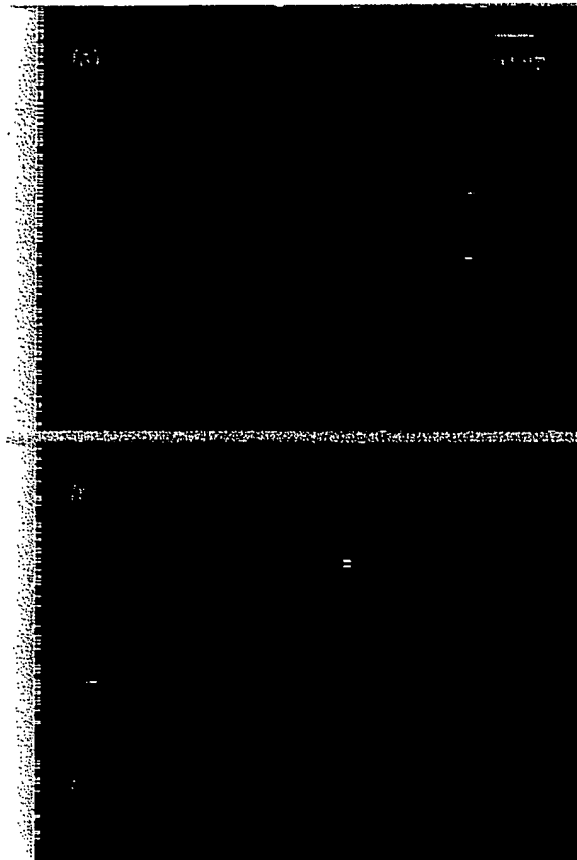
【図4】



スケールバーはサイトあたりの置換の確率を示す。

BEST AVAILABLE COPY

【図5】



BEST AVAILABLE COPY

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	(参考)
C 1 2 Q	1/68	(C 1 2 N	1/20
//(C 1 2 N	1/20	C 1 2 R	1:01)
C 1 2 R	1:01)	C 1 2 N	15/00
			Z N A A

(72)発明者 原山 重明
岩手県釜石市平田第3地割75番1 株式会
社海洋バイオテクノロジー研究所釜石研究
所内

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA17 CA02 CA09 CA20
GA27 HA13 HA14
4B063 QA01 QA18 QQ06 QQ50 QQ54
QR32 QR39 QR56 QS16 QS25
QS34 QX02
4B065 AA01X AC20 BA23 BB01
BC01 BC31 BC46 BC50 BD50
CA56